

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 26 January 2001 (26.01.01)	
International application No. PCT/EP00/04003	Applicant's or agent's file reference 4576/4
International filing date (day/month/year) 04 May 2000 (04.05.00)	Priority date (day/month/year) 04 May 1999 (04.05.99)
Applicant HOERRMANN, Wilhelm	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

01 December 2000 (01.12.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election
- ☒
- was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Charlotte ENGER

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 4576/4	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/04003	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 04/05/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 04/05/1999
Anmelder HOERRMANN, Wilhelm		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 G01N33/50 C12P13/24

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 G01N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 33578 A (HOERRMANN WILHELM) 18. September 1997 (1997-09-18) Zusammenfassung Ansprüche 1-29 --- -/--	1-19

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. Dezember 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

21/12/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Goetz, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1996 MORI HIDEO ET AL: "Detection of novel proline 3-hydroxylase activities in Streptomyces and Bacillus spp. by regio- and stereospecific hydroxylation of L-proline." Database accession no. PREV199699037561 XP002154373 Zusammenfassung & APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 62, Nr. 6, 1996, Seiten 1903-1907, ISSN: 0099-2240</p> <p>---</p>	1-19
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1984 BIENKOWSKI R S: "A CRITERION TO DETERMINE WHETHER CIS-4 HYDROXY PROLINE IS PRODUCED IN ANIMAL TISSUES" Database accession no. PREV198478044739 XP002154374 Zusammenfassung & ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, Bd. 229, Nr. 2, 1984, Seiten 455-458, ISSN: 0003-9861</p> <p>-----</p>	1-19



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 00/04003

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9733578 A	18-09-1997	AU 2380097 A	01-10-1997
		CA 2248765 A	18-09-1997
		DE 19780207 D	11-03-1999
		DE 59702322 D	12-10-2000
		EP 0912172 A	06-05-1999
		JP 2000506174 T	23-05-2000
		US 6066665 A	23-05-2000



PCTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 33/50	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/67022 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. November 2000 (09.11.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/04003 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. Mai 2000 (04.05.00) (30) Prioritätsdaten: 199 20 434.9 4. Mai 1999 (04.05.99) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: ✓ HOERRMANN, Wilhelm [DE/DE]; Staltacher Str. 34, D-82393 Iffeldorf (DE). (74) Anwalt: GRÄTINGER & PARTNER (GBR); Postfach 16 55, D-82306 Starnberg 1 (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: LABORATORY EXAMINATION OF A BODY FLUID OR TISSUE SAMPLE (54) Bezeichnung: LABORMÄSSIGE UNTERSUCHUNG EINER KÖRPERFLÜSSIGKEITS- ODER GEWEBEPROBE (57) Abstract <p>The invention relates to a laboratory examination of a body fluid or tissue sample in which a quantitatively analytical detection of cis-hydroxyproline and the derivatives thereof is carried out. An analysis kit is provided which, using the HPLC method, is suited for determining the quantity of cis-hydroxyproline and derivatives thereof in the sample. Said analysis kit comprises HCl (10 M), NaOH (16 M), Na₂CO₃ (4 M), ortho-phthaldialdehyde, an aqueous phosphate buffer and dabsyl chloride.</p> (57) Zusammenfassung <p>Bei einer labormässigen Untersuchung einer Körperflüssigkeits- oder Gewebeprobe erfolgt ein quantitativ analytischer Nachweis von cis-Hydroxyprolin und Derivaten hiervon. Ein für die Bestimmung des Gehalts der Probe an cis-Hydroxyprolin und Derivaten hiervon unter Anwendung der HPLC-Methode geeigneter Analysekit umfasst HCl (10 M), NaOH (16 M), Na₂CO₃ (4 M), Ortho-Phthaldialdehyd, wässrigen Phosphat-Puffer und Dabsylchlorid.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidsschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Labormäßig Untersuchung einer Körperflüssigkeits- oder Gewebeprobe

Die Medizin kennt den Begriff der Krankheitsprädisposition, was bedeutet, daß bei manchen Menschen die Wahrscheinlichkeit, eine bestimmte Krankheit zu erwerben, größer ist als bei anderen. Kommt es aufgrund einer solchen Prädisposition, die vielfach genetisch bedingt ist, zu einer Erkrankung, ohne daß diese bereits klinische Symptome auslöst, so ist die entsprechende Erkrankung häufig entweder überhaupt nicht, oder nur mit sehr aufwendigen und belastenden Methoden nachweisbar.

Damit die Durchführung solcher aufwendiger und belastender Methoden auf Fälle beschränkt werden kann, in denen eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Krankheitsprädisposition besteht, wäre es wünschenswert, ein Indikator für eine Krankheitsprädisposition ließe sich mit geringem Aufwand im Rahmen einer labormäßigen Untersuchung einer Körperflüssigkeits- oder Gewebeprobe ermitteln.

Gelöst wird diese Aufgabe gemäß der vorliegenden Erfindung dadurch, daß bei einer labormäßigen Untersuchung einer Körperflüssigkeits- oder Gewebeprobe ein quantitativ analytischer Nachweis von cis-Hydroxyprolin und Derivaten hiervon erfolgt. Die vorliegende Erfindung nutzt die Erkenntnis, daß es sich bei cis-Hydroxyprolin, insbesondere bei cis-4-Hydroxyprolin um körpereigene Substanzen handelt, deren Vorkommen im Körper in Körperflüssigkeiten wie auch im Gewebe in Abhängigkeit steht zur Prädisposition für verschiedene

Krankheiten. Diese Erkenntnis ist durchaus überraschend. Nicht nur, daß bisher von einer derartigen Abhängigkeit nichts bekannt war. Mehr noch, bisher war sogar unbekannt, daß es sich bei cis-Hydroxyprolin überhaupt um körpereigene Substanzen handelt. Vielmehr ging man in der Fachwelt bisher davon aus, daß im Körper eine Synthese von cis-Hydroxyprolin, insbesondere von cis-4-Hydroxyprolin nicht erfolgt. Bekannt war lediglich, daß im menschlichen Körper trans-4-Hydroxyprolin gebildet wird.

Für diese trans-Form des Hydroxyprolins ist der Wert einer labormäßigen Untersuchung einer Körperflüssigkeits- oder Gewebeprobe schon seit längerer Zeit bekannt, wobei sich der Knochenabbau, insbesondere bei Osteoporose, analytisch quantitativ bestätigen und näher erfassen läßt.

Die vorliegende Erfindung baut auf der Erkenntnis auf, daß der bisher nicht als körpereigene Substanz beobachteten cis-Form des Hydroxyprolins eine große Bedeutung bei anderen Erkrankungen zukommt, zu denen insbesondere Krebs und Kreislauferkrankungen gehören.

Die gemäß der vorliegenden Erfindung durchgeführte quantitativ analytische Bestimmung von cis-Hydroxyprolin erweist sich nicht nur als zweckmäßig, um einen Indikator für eine Krankheitsprädisposition zu ermitteln. Vielmehr kann die Erfindung auch bei bereits klinisch bestehender Erkrankung zum Einsatz kommen. Mit der quantitativen Bestimmung von cis-4-Hydroxyprolin in Körperflüssigkeiten und/oder Geweben lassen sich insbesondere erniedrigte Spiegel dieser Substanz bestimmen, die im Zusammenhang stehen können mit einer auf meta-

bolische Ursachen zurückgehenden ungenügenden körpereigenen Synthese dieser Substanz bei Vorstadien oder Frühformen von Erkrankungen. Ebenso lassen sich in Anwendung der vorliegenden Erfindung gegenüber normalen cis-4-Hydroxyprolin-Werten erhöhte Werte nachweisen, die im Zusammenhang stehen können mit einem Gewebeumbau oder sogar Gewebezerfall.

Von besonderem Wert ist die erfindungsgemäße cis-Hydroxyprolin-Bestimmung auch im Rahmen der Verlaufskontrolle des Krankheitsgeschehens, was auch für die Beurteilung der Wirksamkeit therapeutischer Maßnahmen und ihrer Dosierung wichtig ist.

Die vorliegende Erfindung umfaßt deshalb den Nachweis und die quantitative Bestimmung des cis-Hydroxyprolins im menschlichen wie auch im Säugetierorganismus, und zwar in sämtlichen Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Lymphe, Liquor cerebrospinalis, Ascites, anderen Exsudaten, aber auch in Körpergeweben.

Die Bestimmung bezieht sich nicht nur auf das cis-4-hydroxy-L-prolin, sondern auch auf die anderen Konfigurationen des cis-Hydroxyprolins wie L- und D-Form sowie eine verschiedene Ringpositionierung der Hydroxylgruppe. Sie bezieht sich auch auf Derivate des cis-Hydroxyprolins wie N-methyl-cis-Hydroxyprolin, und sie bezieht sich auf jene Peptid- oder sonstigen Verbindungen, aus denen die genannten Substanzen zum Zwecke der Untersuchung erst herausgelöst werden müssen.

Die Bestimmung der genannten Verbindung kann mit verschiedenen an sich bekannten analytischen Verfahren erfolgen, wozu die Gaschromatographie, die

Säulenchromatographie, die Massenspektroskopie, das HPLC-Verfahren, die Ionenaustauschchromatographie, Immunassays, Radio-Immunassays, Enzym-Immunassays, Fluoreszenz-Immunassays und andere gehören. Bei der Spaltung von Peptid- und ähnlichen Verbindungen ist auf die Verwendung üblicher schonender Verfahren zu achten.

Ein bevorzugtes Verfahren, das im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Bestimmung von cis-Hydroxyprolin und dessen Derivaten in einer Körperflüssigkeits- oder Gewebeprobe einsetzen läßt, ist im Anspruch 4 angegeben, wobei bevorzugte Weiterbildungen den auf Anspruch 4 zurückbezogenen Unteransprüchen zu entnehmen sind.

Gemäß dem in Anspruch 4 angegebenen Verfahren wird zur Bestimmung von cis-Hydroxyprolin und dessen Derivaten in Körperflüssigkeiten und/oder Geweben die zu analysierende Probe zur Beseitigung störender Substanzen aufbereitet und der Gehalt an cis-Hydroxyprolin und dessen Derivaten in dieser Probe quantitativ bestimmt. Was unter dem Begriff "störende Substanz" zu verstehen ist, richtet sich nach der jeweils angewandten Bestimmungsmethode. Im Falle der Anwendung der HPLC-Methode sind als störende Substanzen solche zu verstehen, die aufgrund eines übereinstimmenden Absorptionsverhaltens bei im wesentlichen gleicher Retentionszeit die Messung des cis-Hydroxyprolins und seiner Derivate verfälschen können. Solche Substanzen sind zu eliminieren. Damit ist es möglich, cis-4-Hydroxyprolin z.B. in der im menschlichen Körper vorliegenden Konzentration von $< 1 \mu\text{g/ml}$ zu bestimmen.

Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung des Gehaltes an cis-Hydroxyprolin in Körperflüssigkeiten und/oder Geweben durch Vergleich mit einem externen und/oder internen Standard. Damit ist eine zuverlässige Quantifizierung der Konzentration von cis-Hydroxyprolin möglich, auch in den vorstehend genannten geringen Konzentrationen.

Für die Bestimmung des Gehalts an cis-4-Hydroxyprolin unter Anwendung der HPLC-Methode bei einer Anregungswellenlänge von 471 nm hat sich als geeigneter interner Standard cis-3-Hydroxyprolin (cis-3-HYP) erwiesen, dessen Retentionszeit (6,00 min) bei Verwendung einer geeigneten Trennsäule (z.B. RP-8) und einer günstigen Meßtemperatur (z.B. 60°C) deutlich länger ist als die von cis-4-Hydroxyprolin (4,60 min) und trans-4-Hydroxyprolin (3,30 min).

Bevorzugt erfolgt dabei die Aufbereitung der zu analysierenden Probe in mehreren Schritten, wobei die Körperflüssigkeit und/oder das Gewebe mit einem internen Standard (s.o.) versetzt, die gemäß diesem Schritt erhaltene Mischung hydrolysiert, anschließend die hydrolysierte Mischung mit mindestens einem Alkalihydroxyd und mindestens einem Alkalicarbonat versetzt, das Produkt aus diesem Schritt mit einem Störsubstanzen entfernenden Reagenz und einem Derivatisierungsreagenz behandelt und anschließend der Gehalt an cis-4-Hydroxyprolin und dessen Derivaten quantitativ bestimmt wird. Dabei hat es sich als vorteilhaft erwiesen, daß die Hydrolyse in Gegenwart einer starken Mineralsäure, insbesondere Salzsäure, bei erhöhter Temperatur, besonders bevorzugt bei einer Temperatur von etwa 100°C erfolgt. Ebenso ist es besonders

vorteilhaft, wenn der pH der hydrolysierten Mischung auf einen Wert zwischen 8,5 und 9,0 eingestellt wird. Als für die Erfindung geeignete basische Alkalimetallverbindungen sind die Hydroxyde, Carbonate und/oder Bicarbonate des Natriums oder Kaliums vorzugsweise einsetzbar.

Als Reagenz, mit dem Störsubstanzen entfernt werden, eignen sich insbesondere Keto-Gruppen enthaltende Verbindungen. Dabei haben sich als Keto-Verbindungen Aldehyde, insbesondere Ortho-Phthaldialdehyd mit einer Konzentration zwischen 45 und 55 g/l, insbesondere von 50 g/l als geeignet erwiesen. Nach Stehenlassen bei Raumtemperatur wird dann ggf. gebildeter Niederschlag durch Sedimentation, Zentrifugation, Filtration oder ein sonstiges geeignetes Verfahren abgetrennt.

Zu der vorstehend erhaltenen, von Niederschlag befreiten Lösung werden anschließend als Laufmittel ein wässriger Phosphatpuffer und ein Derivatisierungsreagenz zugesetzt, mit dem das zu bestimmende cis-4-Hydroxyprolin chemisch modifiziert wird. Übliche und auch im Stand der Technik bekannte Derivatisierungsreagenzien sind Azofarbstoffe, wobei Dabsylchlorid mit einer Konzentration zwischen 220 und 270 mg/l, insbesondere von 242,8 mg/l von besonderem Interesse ist. Zur Beschleunigung der Reaktion wird vorteilhafterweise das Gemisch aus zu analysierender Probe, Puffer und Derivatisierungsreagenz kurz (z.B. ca. 15 min) auf Temperaturen von ca. 70°C erwärmt.

Falls erforderlich, wird die im vorstehenden Schritt erhaltene Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt und ggf. noch mit einer geringen Menge desselben wie im

vorstehenden Schritt eingesetzten wässrigen Phosphatpuffers als Laufmittel versetzt. Die quantitative Bestimmung des cis-4-Hydroxyprolins und dessen Derivate erfolgt dann bei einer solchermaßen aufbereiteten Probe mittels HPLC.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Beispiele näher erläutert:

Beispiel 1:

Herstellung von externen/internen Standardlösungen für die Quantifizierung von cis-4-Hydroxyprolin in Körperflüssigkeiten

a) Herstellen einer externen Standardlösung: cis-4-(L)-HYP, trans-4(L)-HYP, cis-3-(DL)-HYP

- 1) Stammlösung: $c = 0,1 \text{ mg/ml}$; (gleiche Volumina einer Lösung von 5 mg cis-4-HYP sowie 5 mg trans-4-HYP in 25 ml Reinstwasser (bi-distilliertes Wasser) und einer Lösung von 5 mg cis-3-HYP in 25 ml Reinstwasser werden gemischt)
- 2) 1 ml HCl (6 M) und 1 ml von 1) mischen
- 3) 1 ml von 2) mit 5 ml NaOH (0,5 M) und 5 ml Na_2CO_3 (0,25 M) mischen
- 4) pH-Wert auf 8,5 durch Zusatz von HCl (32%, 10 M) einstellen
- 5) 10 ml von 4) mit 15 ml Dabsylchlorid ($c = 242,8 \text{ mg/l}$) mischen, 10 min auf 70°C erhitzen

- 6) auf Raumtemperatur abkühlen lassen, danach mit Aceton (falls eine Trübung auftritt, werden ein paar Tropfen Reinstwasser bis zur Auflösung zugegeben) auf 25 ml auffüllen
 - 7) 25 ml von 6) werden mit Reinstwasser auf 146,156 ml aufgefüllt.
- b) Herstellung einer internen Standardlösung (IS):
cis-3- (DL) -HYP
Gleiche Volumenteile der oben verwendeten Lösung von cis-3-HYP (5 mg in 25 ml Reinstwasser) und Reinstwasser werden gemischt.

Beispiel 2:**Quantitative Bestimmung von cis-4-HYP in Urin**

- 1) 1 ml Probeurin wird mit 1 ml HCl (10 M) und 0,1 ml IS gemäß Beispiel 1 versetzt und 16 h bei 100°C hydrolysiert.
- 2) 1 ml von 1) wird mit je 0,25 ml einer wässrigen Lösung von NaOH (16 M) und Na₂CO₃ (4 M) versetzt. Ggf. wird der pH-Wert mit 10 M HCl auf pH 8,5 bis 9,0 eingestellt.
- 3) 0,5 ml von 2) wird mit 0,2 ml Ortho-Phthaldialdehyd (c = 50 g/l) und mit 0,2 ml Reinstwasser innig gemischt und für 60 min stengelassen. Danach wird ggf. ausgefallener Niederschlag abzentrifugiert.
- 4) 0,15 ml der überstehenden Lösung von 3) werden mit 0,2 ml eines wässrigen Phosphatpuffers (22 Massen-% Acetonitril, 78 Massen-% Reinstwasser, di-Natrium-

hydrogenphosphat-Dodecahydrat, Citronensäure, pH = 4,7) sowie 0,2 ml Dabsylchlorid ($c = 242,8 \text{ mg/l}$) versetzt, das Reaktionsgefäß fest verschlossen und im Trockenschrank während 15 min auf 70°C erhitzt.

- 5) Die Reaktionslösung von 4) wird auf Raumtemperatur abgekühlt und im Anschluß mit weiteren 0,3 ml wässrigen Phosphatpuffer als Laufmittel versetzt.
- 6) HPLC-Messung unter Verwendung einer RP-8-Trennsäule bei einer Meßtemperatur von 60°C im Säulenofen und einer Anregungswellenlänge von 471 nm: Injektionsvolumen: $20 \mu\text{l}$

Untersucht wurden Urinproben von 10 männlichen und 10 weiblichen Probanden verschiedenen Alters.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Meßergebnisse zusammen mit den Angaben über Harnstoff-, Kreatinin- und Gesamteiweiß der jeweiligen Probe aufgelistet:

Tabelle 1: Chromatographische Quantifizierung von
cis-4-HYP nativen Urinen

X ^a	Alter (Y), Geschlecht	Harnstoff (mg/dl)	Kreatinin (mg/dl)	U/CSF (mg/dl)	c(trans-4-HYP) (µg/ml)	c(cis-4-HYP) (µg/ml)
51	62, w	675 T	34,41	< 2	6,7	0,4
52	56, w	1628	71,42	3,1	8,6	0,4
53	19, w	1360	141,81	15,1	38,0	1,3
54	6 Tage, w	130 T	12,90	7,6	110	1,8
55	49, w	410 T	13,13	10,4	6,8	0,2
56	86, w	474 T	23,40	< 2	4,9	0,3
57	56, w	1726	105,35	9,4	24	1,2
58	83, w	763 T	48,03	5,5	5,8	0,5
59	33, w	802 T	80,23	2,6	22,8	0,3
60	65, w	957	16,34	< 2	12,6	0,2
I ^b					8,4	0,6
II ^b					9,4	1,4
III ^b					8,9	11,6
61	35, m	1866	151,27	4,6	26,9	0,5
62	69, m	2480	51,57	5,3	22,6	0,9
63	81, m	2197	91,77	4,8	45,0	1,5
64	86, m	2068	130,50	7,8	24,5	1,7
65	50, m	2221	194,16	9,1	31,2	0,9
66	60, m	772 T	120,69	5,4	20,3	0,8
67	57, m	2597	171,67	13,4 H	25	0,7
68	45, m	1375	70,94	< 2	7,6	0,5
69	35, m	351 T	74,06	12,5 H	17	0,2
70	69, m	337 T	75,23	6,8	5,9	0,2
I ^b					8,6	0,3
II ^b					7,9	4,5
III ^b					8,6	11,1

a) Proben-Nr-EOXO-X

b) Kontrollurine I - III

I: c(cis-4-HYP) = 0,3 µg/ml

II: c(cis-4-HYP) = 1,4 µg/ml

III: c(cis-4-HYP) = 11,2 µg/ml

I - III: c(trans-4-HYP) = 8,7 µg/ml

Ansprüche

1. Labormäßige Untersuchung einer Körperflüssigkeits- oder Gewebeprobe, dadurch gekennzeichnet, daß ein quantitativ analytischer Nachweis von cis-Hydroxyprolin und Derivaten hiervon erfolgt.
2. Labormäßige Untersuchung einer Körperflüssigkeits- oder Gewebeprobe gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein quantitativ analytischer Nachweis von cis-4-Hydroxyprolin erfolgt.
3. Labormäßige Untersuchung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der quantitativ analytische Nachweis des cis-Hydroxyprolins und seiner Derivate mittels HPLC, Säulenchromatographie, Gaschromatographie, Massenspektroskopie, Ionenaustauschchromatographie, Immunassays, Radio-Immunassays, Enzym-Immunassays, Fluoreszenz-Immunassays oder andere entsprechende Antikörper-Verfahren durchgeführt wird.
4. Verfahren zur Bestimmung von cis-Hydroxyprolin und dessen Derivaten im Rahmen einer labormäßigen Untersuchung einer Körperflüssigkeits- oder Gewebeprobe gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zu analysierenden Körperflüssigkeits- oder Gewebeprobe zur Beseitigung störender Substanzen aufbereitet und der Gehalt an cis-Hydroxyprolin und dessen Derivaten in dieser Probe quantitativ bestimmt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Bestimmung des cis Hydroxyprolins und
dessen Derivate mittels HPLC, Gaschromatographie,
Säulenchromatographie, Massenspektroskopie,
Ionenaustauschchromatographie, RIA, ELISA oder
Fluoreszenz-Immunassay durchgeführt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Bestimmung des Gehalts an cis-Hydroxyprolin
und dessen Derivaten durch Vergleich mit einem
externen und/oder internen Standard erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 4, wobei der Gehalt der
Körperflüssigkeits- oder Gewebeprobe an cis-4-
Hydroxyprolin mittels HPLC bestimmt wird, umfassend
die folgenden Schritte:
 - a) die Körperflüssigkeits- oder Gewebeprobe wird
mit einem internen Standard versetzt;
 - b) die gemäß Schritt a) erhaltene Mischung wird
hydrolysiert;
 - c) das gemäß Schritt b) erhaltene Produkt wird mit
mindestens einem Alkalihydroxyd und mindestens
einem Alkalicarbonat versetzt;
 - d) das gemäß Schritt c) erhaltene Produkt wird mit
einem Reagenz, mit dem Störsubstanzen entfernt
werden und einem Derivatisierungsreagenz
versetzt; und
 - e) der Gehalt an cis-4-Hydroxyprolin und dessen
Derivaten in dem in Schritt d) erhaltenen
Produkt wird bestimmt.

8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß vor Schritt b) eine Säure zugesetzt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Hydrolyse in Gegenwart von Salzsäure bei
einer Temperatur zwischen 80°C und 120°C erfolgt.
10. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß die in Schritt c) eingesetzten Alkalimetall-
verbindungen Hydroxyde bzw. Carbonate des Natriums
oder Kaliums sind.
11. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß der pH-Wert in Schritt c) durch Zugabe von HCl
auf pH 8,5 bis 9 eingestellt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß in Schritt d) Ortho-Phthaldialdehyd (OPA) und
als Derivatisierungsreagenz ein Azofarbstoff einge-
setzt wird.
13. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß von der quantitativen Bestimmung des cis-4-
Hydroxyprolins und dessen Derivate in Schritt e)
die Temperatur erniedrigt wird.
14. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,

daß die Körperflüssigkeitsprobe in einer Urinprobe oder Blutprobe besteht.

15. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Interner Standard (IS) cis-3-Hydroxyprolin eingesetzt wird.
16. Analysekit zur Durchführung des Verfahrens gemäß Anspruch 7, umfassend HCl (10 M), NaOH (16 M), Na_2CO_3 (4 M), Ortho-Phthaldialdehyd, wässrigen Phosphat-Puffer und Dabsylchlorid.
17. Analysekit nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Konzentration des Ortho-Phthalaldehyds zwischen 45 und 55 g/l beträgt.
18. Analysekit nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Konzentration des Dabsylchlorids zwischen 220 und 270 mg/l beträgt.
19. Analysekit nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß er mindestens eine RP-8-Trennsäule umfaßt.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. November 2000 (09.11.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/67022 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/50, C12P 13/24 (74) Anwalt: GRÄTTINGER & PARTNER (GBR); Postfach 16 55, D-82306 Starnberg 1 (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/04003 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): CA, JP, US.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 4. Mai 2000 (04.05.2000) (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch Veröffentlicht:
— Mit internationalem Recherchenbericht.
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 20 434.9 4. Mai 1999 (04.05.1999) DE (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 26. April 2001
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: HOERRMANN, Wilhelm [DE/DE]; Staltacher Str. 34, D-82393 Iffeldorf (DE).
- 04 Nov 01/30msz*
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: LABORATORY EXAMINATION OF A BODY FLUID OR TISSUE SAMPLE

(54) Bezeichnung: LABORMÄSSIGE UNTERSUCHUNG EINER KÖRPERFLÜSSIGKEITS- ODER GEWEBEPROBE

(57) Abstract: The invention relates to a laboratory examination of a body fluid or tissue sample in which a quantitatively analytical detection of cis-hydroxyproline and the derivatives thereof is carried out. An analysis kit is provided which, using the HPLC method, is suited for determining the quantity of cis-hydroxyproline and derivatives thereof in the sample. Said analysis kit comprises HCl (10 M), NaOH (16 M), Na₂CO₃ (4 M), ortho-phthalaldehyde, an aqueous phosphate buffer and dabsyl chloride.

(57) Zusammenfassung: Bei einer labormässigen Untersuchung einer Körperflüssigkeits- oder Gewebeprobe erfolgt ein quantitativ analytischer Nachweis von cis-Hydroxyprolin und Derivaten hiervon. Ein für die Bestimmung des Gehalts der Probe an cis-Hydroxyprolin und Derivaten hiervon unter Anwendung der HPLC-Methode geeigneter Analysekit umfasst HCl (10 M), NaOH (16 M), Na₂CO₃ (4 M), Ortho-Phthalaldehyd, wässrigen Phosphat-Puffer und Dabsylchlorid.

WO 00/67022 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/EP 00/04003

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/50 C12P13/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 33578 A (HOERRMANN WILHELM) 18 September 1997 (1997-09-18) abstract claims 1-29 --- -/--	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *8* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 December 2000

Date of mailing of the international search report

21/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Goetz, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/04003

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1996 MORI HIDEO ET AL: "Detection of novel proline 3-hydroxylase activities in Streptomyces and Bacillus spp. by regio- and stereospecific hydroxylation of L-proline." Database accession no. PREV199699037561 XP002154373 abstract & APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 62, no. 6, 1996, pages 1903-1907, ISSN: 0099-2240</p>	1-19
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1984 BIENKOWSKI R S: "A CRITERION TO DETERMINE WHETHER CIS-4 HYDROXY PROLINE IS PRODUCED IN ANIMAL TISSUES" Database accession no. PREV198478044739 XP002154374 abstract & ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol. 229, no. 2, 1984, pages 455-458, ISSN: 0003-9861</p>	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/04003

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9733578 A	18-09-1997	AU 2380097 A	01-10-1997
		CA 2248765 A	18-09-1997
		DE 19780207 D	11-03-1999
		DE 59702322 D	12-10-2000
		EP 0912172 A	06-05-1999
		JP 2000506174 T	23-05-2000
		US 6066665 A	23-05-2000



9

3

6

4

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 17 MAY 2001

WIPO PCT

75


Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 4576/4	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/04003	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 04/05/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 04/05/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/50		
Anmelder HOERRMANN, Wilhelm		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 01/12/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 15.05.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Goetz, M Tel. Nr. +49 89 2399 8697



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-10 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-19 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/04003

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1 - 19
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1 - 19
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1 - 19
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: WO97/33578

D2: Database BIOSIS [Online], accession N° PREV199699037561
& Applied and Environmental Microbiology 62/6, 1996, S. 1903 - 1907

D3: Database BIOSIS [Online], accession N° PREV198478044739
& Arch. Biochem. Biophys. 229/2, 1984, S. 455 - 458

2. Die drei oben genannten Dokumente betreffen die Verwendung von cis-Hydroxyprolin als therapeutischem Wirkstoff (D1), die Feststellung des Vorkommens von cis-Hydroxyprolin in bestimmten bakteriellen Spezies (D2) sowie die Analyse von radioaktiv markiertem cis-Hydroxyprolin als theoretischem Abbauprodukt des trans-Isomers (D3); keinem der drei Schriften ist jedoch auch nur der geringste Hinweis auf eine labormässige Erfassung von cis-Hydroxyprolin als körpereigene Substanz zu entnehmen.

Der jeweilige Gegenstand der Ansprüche 1 - 15 ist daher neu und beruht auf erfinderischer Tätigkeit (Art. 33(2) und (3) PCT).

3. Obwohl die Zweckbestimmung des Anspruches 16 ("*... zur Durchführung des Verfahrens gemäss Anspruch 7 ...*") keinerlei strukturell beschränkende Wirkung hat, ist ein Analysekit der genannten Zusammensetzung im Stand der Technik nicht bekannt.

Ansprüche 16 - 19 entsprechen daher ebenfalls den Bestimmungen gemäss Art. 33(2) und (3) PCT.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Der im Anspruch 9 angegebene bevorzugte Temperaturbereich scheint in der Beschreibung nicht erwähnt zu sein; die Beschreibung steht daher nicht, wie in Regel 5.1 a) iii) PCT vorgeschrieben, in Einklang mit den Ansprüchen.



09/1926HHH
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 4576/4	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/04003	International filing date (day/month/year) 04 May 2000 (04.05.00)	Priority date (day/month/year) 04 May 1999 (04.05.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/50, C12P 13/24		
Applicant HOERRMANN, Wilhelm		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 01 December 2000 (01.12.00)	Date of completion of this report 15 May 2001 (15.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/04003

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☒ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-10, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-19, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/04003

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The following documents are cited:

D1: WO-97/33578

D2: Database BIOSIS [Online], accession N°
PREV199699037561 & Applied and Environmental
Microbiology 62/6, 1996, pages 1903-1907

D3: Database BIOSIS [Online], accession N°
PREV198478044739 & Arch. Biochem. Biophys.
229/2, 1984, pages 455-458.

2. The three documents mentioned above relate to the use of cis-hydroxyproline as a therapeutic agent (D1), the establishment of the presence of cis-hydroxyproline in particular bacterial species (D2) and the analysis of radioactively tagged cis-hydroxyproline as a theoretical decomposition product of the trans-isomer (D3); none of the three publications, however, contains the least hint of laboratory detection of cis-hydroxyproline as an endogenous substance.

The subject matter of Claims 1-15 is therefore novel and involves an inventive step (PCT Article 33(2) and (3)).

3. Although the stipulation of purpose in Claim 16 (*"for carrying out the method claimed in Claim 7"*) has no structurally limiting effect, an analysis kit of the composition described is not known in the prior art.

Claims 16-19 therefore also meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/04003

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The preferred temperature range given in Claim 9 does not appear to be mentioned in the description; the description is therefore not in line with the claims as specified in PCT Rule 5.1(a)(iii).

THIS PAGE BLANK (USPTO)